

PCT/KR 03/00882

RO/KR 01.05.2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2002-0024245
Application Number

REC'D 20 MAY 2003

WIPO PCT

출원년월일 : 2002년 05월 02일
Date of Application MAY 02, 2002

출원인 : 주식회사 두산
Applicant(s) DOOSAN CORPORATION

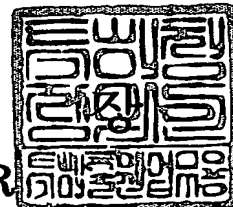
BEST AVAILABLE COPY



2003 년 05 월 01 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

| | |
|------------|---|
| 【서류명】 | 특허출원서 |
| 【권리구분】 | 특허 |
| 【수신처】 | 특허청장 |
| 【제출일자】 | 2002.05.02 |
| 【발명의 명칭】 | 엔 ,엔-디메틸파이토스핑고신, 그 제조방법 및 그를 함유한 조성물 |
| 【발명의 영문명칭】 | N,N-dimethylphytosphingosine, a method for producing the compound and a composition containing the compound |
| 【출원인】 | |
| 【명칭】 | 주식회사 두산 |
| 【출원인코드】 | 1-1998-000923-6 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 최원현 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000569-6 |
| 【포괄위임등록번호】 | 1999-028064-8 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 김영철 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000040-3 |
| 【포괄위임등록번호】 | 1999-028062-3 |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 최진희 |
| 【성명의 영문표기】 | CHOI, Jin Hee |
| 【주민등록번호】 | 740222-2792411 |
| 【우편번호】 | 130-062 |
| 【주소】 | 서울특별시 동대문구 제기2동 1193 22/4 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 박장서 |
| 【성명의 영문표기】 | PARK, Chang Seo |
| 【주민등록번호】 | 540811-1066814 |
| 【우편번호】 | 427-040 |
| 【주소】 | 경기도 과천시 별양동 주공아파트 710-401 |
| 【국적】 | KR |

【발명자】

【성명의 국문표기】 김진욱
 【성명의 영문표기】 KIM, Jin Wook
 【주민등록번호】 651120-1009923
 【우편번호】 449-846
 【주소】 경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 699 한국아파트 102-306
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박창열
 【성명의 영문표기】 PARK, Chang Yeol
 【주민등록번호】 680508-1119712
 【우편번호】 449-020
 【주소】 경기도 용인시 서구 김량장동 338-6 태성아파트 301호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 황유아
 【성명의 영문표기】 HWANG, You-A
 【주민등록번호】 760624-2082019
 【우편번호】 464-892
 【주소】 경기도 광주군 오포면 능평리 401-1
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김은주
 【성명의 영문표기】 KIM, Eun Ju
 【주민등록번호】 760804-2167423
 【우편번호】 449-905
 【주소】 경기도 용인시 기흥읍 상갈리 122-23 영진빌라 302호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 고의찬
 【성명의 영문표기】 KOH, Ui Chan
 【주민등록번호】 501023-1011721

0020024245

출력 일자: 2003/5/12

【우편번호】 135-010

【주소】 서울특별시 강남구 논현동 105 동현아파트 1-201

【국적】 KR

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
최원
현 (인) 대리인
김영철 (인)

【수수료】

| | | |
|----------|----------|----------|
| 【기본출원료】 | 20 면 | 29,000 원 |
| 【가산출원료】 | 2 면 | 2,000 원 |
| 【우선권주장료】 | 0 건 | 0 원 |
| 【심사청구료】 | 0 항 | 0 원 |
| 【합계】 | 31,000 원 | |

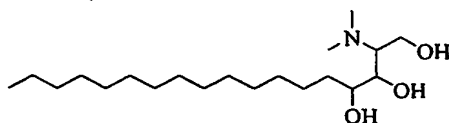
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 디메틸파이토스핑고신에 관한 것이다. 본 발명에 의한 화합물은 하기 화학식 1의 N,N-디메틸파이토스핑고신 화합물인 것을 특징으로 한다.

[화학식 1]



본 발명에 의한 화합물 및 그를 포함하는 조성물을 이용하면, 항균, 항염 및 항암 등에 효과가 기대되고 또한 대량 생산으로 활용도가 높은 효과가 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

디메틸파이토스핑고신, 항염, 항암, 항균, 세포살상, 아포토시스

【명세서】**【발명의 명칭】**

엔,엔-디메틸파이토스핑고신, 그 제조방법 및 그를 함유한 조성물
{N,N-dimethylphytosphingosine, a method for producing the compound and a composition
containing the compound}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 의한 N,N-디메틸파이토스핑고신(DMPS)의 ^1H NMR 스펙트럼이다.

도 2는 본 발명에 의한 N,N-디메틸파이토스핑고신의 MALDI-MASS 스펙트럼이다.

도 3은 본 발명에 의한 N,N-디메틸파이토스핑고신의 항균 활성을 나타내는 그래프
이다.

도 4는 본 발명에 의한 N,N-디메틸파이토스핑고신의 세포독성 효과를 나타내는 그
래프이다.

도 5는 본 발명에 의한 N,N-디메틸파이토스핑고신의 DNA 단편화 효과를 나타내는
전기영동 결과이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<6> 본 발명은 N,N-디메틸파이토스핑고신, 그 제조방법 및 그를 함유하는 항균용 조성
물, 항염용 조성물 그리고 항암용 조성물에 관한 것이다. 스펙고신(sphingosine) 및 파
이토스핑고신(phytosphingosine) 그리고 이들 각각의 아미노기에 지방산이 펩타이드 결

합한 세라마이드(ceramide), 당이 한 종류 내지 여러 종류가 글리코시드 결합한 스펡고당지질 그리고 인산, 콜린, 에탄올아민 등의 염기가 결합한 스펡고미엘린(sphingomyelin) 등의 스펡고인지질을 포함하여 많은 종류의 스펡고지질이 신경계의 세포막 표면을 비롯하여 생체 내에 광범위하게 존재하고 있음이 알려져 있다. 비타민 D3에 의해 유도되는 스펡고미엘린의 분해(degradation)가 처음 보고되면서 생체 막의 스펡고지질의 분해 과정(degrading processes)에 대한 활발한 연구가 진행되었고 SM 사이클 혹은 SM-세라마이드 경로(pathway)라는 새로운 신호 전이과정이 알려지게 되었다. 일반적으로 TNF α , IL-1 β , FAS 리간드 혹은 레디에이션(radiation)에 의해 스펡고미엘리네이스(sphingomyelinase)가 활성화되어 세라마이드가 형성되고 이것이 세포의 성장, 증식, 분화의 조절, 아포토시스(apoptosis) 등과 같이 스트레스와 관계되는 반응에 대한 매개체(biomodulator 또는 lipid second messenger)로서 작용을 하는 것으로 밝혀져 있다 (Kolesnick, R. and Golde, D.W. 1994 Cell 77, 325-328 : Hannun, Y.A. 1996 Science 274, 1855-1859).

<7> 하지만 최근 이러한 경로(pathway)를 통하여 특히 강조되는 것은 세라마이드 뿐만 아니라 인산화된 스펡고신(sphingosine 1-phosphate), 스펡고신, 파이토스페링고신, 메틸화된 스펡고신(N-methylsphingosines) 등 다른 물질들도 함께 생성되며 이들 또한 생리 활성적으로 중요한 물질로 인식되고 있다는 점이다.

<8> 인산화된 스펡고신은 PDGF(platelet derived growth factor)가 관여하는 세포 증식에 대한 전달체(second messenger)이다. 또한 혈소판에 다량 있어 혈소판을 활성화시키기도 하고 또 활성화된 혈소판으로부터 나와서 지혈, 혈전증, 상처치료에 관여하는 등 병태생리학적인 기능을 하는 것으로 알려져 있으며 세포의 운동성을 조절하는 전달체

(first messenger)로서 기능을 하기도 한다. 스펡고신은 세라미데이즈(ceramidase)에 의해 생성되는 PKC 억제제로서 암세포의 아포토시스를 유발시키는 역할을 한다. 메틸화된 스펡고신 중에서 디메틸스퍽고신 (N,N-dimethylsphingosine)은 세포 내에서 대사적으로 안정한 스펡고신이라 불릴 만큼 그 기능 또한 스펡고신과 유사하다. 하지만 스펡고신보다 더 강력한 PKC 억제제로서 표피암세포, 백형 세포 뿐만 아니라 다양한 암세포에 대한 성장을 억제하는 아포토시스 유발 물질이다. 그리고 혈소판의 활성화 및 인산화된 스펡고신의 유리를 억제하는 영향도 가지고 있다. 트리메틸스퍽고신 (N,N,N-trimethylsphingosine)은 디메틸스퍽고신의 세포 독성과 물에 대한 용해도를 개선한 물질로서 디메틸스퍽고신과 비슷하게 강한 PKC 억제효과를 가지고 있다. 하지만 아포토시스의 기능은 없고 디메틸스퍽고신에 비해 스펡고신 인산화 효소를 억제하는 기능 또한 매우 약하다. 그러나 항염의 효과는 탁월한 것으로 알려져 있다(Igarashi, Y. 1997 J. Biochem. 122, 1080-1087). 파이토스퍽고신은 대사에 대한 연구가 주로 이스트 (yeast)를 이용하여 이루어졌으나 이스트 뿐만 아니라 실제로 인체 표피 내에도 존재하는 물질로 밝혀졌으며 PKC 및 PLD 억제 효과가 있고 in vivo 상에서 자외선에 의해 유도되는 염증에 대한 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한 항생제 에리트로마이신 (erythromycin)과 비교하여 여드름균 (*Propionibacterium acnes*)과 포도상 구균 (*staphylococcus aureus*)에 대한 성장 억제 효과가 탁월한 것으로 나타났다(대한민국 특허 2001-15700 박장서 외 : 대한민국 특허 2000-74074 김진욱 외 : US patent 09/691446 Park Changseo et al.).

☞ 그러나 이러한 생리활성 물질은 그 기능면에서는 상당한 주목을 받고 있지만 순수 합성방법으로 제조하기에는 너무 고가여서 경제적으로 사용하는 것이 어려웠다. 또한

인체 내에 존재하는 스펡고지질과는 입체화학적 구조가 다른 경우가 많았으며 추출을 통한 방법 또한 그 기원에 대한 논란이 계속되어 사용하는데 있어 제한이 되어 왔다. 이러한 상황에서 본 발명자들은 이미 모균주 (NRRL Y-1031 (F-60-10))에서 포자분리방법 (spore isolation)으로 선별한 균주를 가지고 (대한민국 특허등록 제 188857 호 : 미국 특허등록 제 6194196 호) 효모 발효를 통해 파이토스펙고신을 대량으로 얻는 방법을 개발하였으며 (대한민국 특허등록 제 221357 호 : 미국 특허등록 제 5958742 호 : 프랑스 특허등록 제 2871502 호) 이렇게 얻은 파이토스펙고신은 인체 내에 존재하는 스펡고지질과 입체화학적으로 동일한 구조를 가지고 있는 것으로 밝혀져 산업적으로 그 활용도가 점점 높아지고 있다. 이에 대량생산이 가능한 파이토스펙고신을 기본 골격으로 한 생리활성 효과가 우수한 다양한 유도체를 개발하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<10> 상기와 같은 필요성에 따라 본 발명은 항균, 항염 및 항암 등에 효과가 기대되고 또한 대량 생산으로 활용도가 높은 신규한 물질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

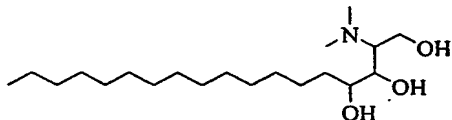
<11> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 의한 화합물은 파이토스펙고신의 아민기에 알킬기가 결합된 것을 특징으로 한다.

<12> 상기한 본 발명에 의한 화합물에 있어서, 상기 알킬기는 메틸, 에틸을 포함하여 짧은 체인인 것을 특징으로 한다.

<13> 상기한 본 발명에 의한 화합물에 있어서, 상기 알킬기는 한 개 또는 두 개인 것을 특징으로 한다.

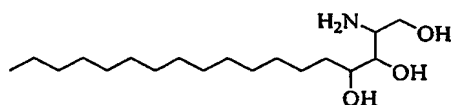
<14> 상기한 본 발명에 의한 화합물에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 1의 N,N-디메틸파이토스펑고신 화합물인 것을 특징으로 한다.

<15> 【화학식 1】

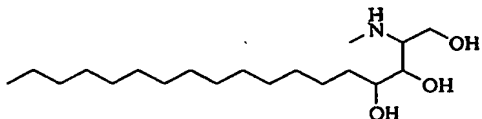


<16> 또한, 본 발명에 의한 제조방법은 상기 화학식 1의 N,N-디메틸파이토스펑고신 화합물의 제조방법으로서, 하기 화학식 2의 파이토스펑고신을 용매 중에서 환원제의 존재 하에 포름알데히드와 반응시켜 하기 화학식 3을 중간물질로 하여 제조하는 것을 특징으로 한다.

<17> 【화학식 2】



<18> 【화학식 3】



<19> 또한, 본 발명에 의한 항균용 조성물, 항염용 조성물 및 항암용 조성물은 상기한 N,N-디메틸파이토스펑고신 화합물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

<20> 또한, 본 발명에 의한 세포살상제 조성물은 상기한 N,N-디메틸파이토스펑고신 화합물을 유효성분으로 포함하여 세포살상을 통해 항암효과를 나타내는 것을 특징으로 한다.

- <21> 상기한 본 발명에 의한 세포살상제에 있어서, 상기 세포살상제는 단위 체중 당 0.5 내지 2.5mg/kg의 양으로 투여되는 것을 특징으로 한다.
- <22> 상기 제조 방법에 대해 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 단백질의 아민 메틸화 반응을 응용한 환원적 메틸화 반응으로 제조하였다. 아민의 반응성을 증가시키기 위하여 하이드라이드를 사용하는데 소듐보로하이드라이드가 바람직하게 사용되며 그 양은 화학식 2의 화합물을 기준으로 하여 8.0 내지 10 몰 배량 사용하는 것이 바람직하다. 용매는 보레이트 버퍼에 메탄올을 동량 섞어 만든 용매를 사용한다. 37 % 포름알데히드 수용액을 일정량씩 시간 간격을 두고 여러 번 가하여 진행시키고 72 시간동안 상온 상태에서 반응은 이루어 진다.
- <23> 그러나, 본 발명에 따른 방법에서 사용될 수 있는 산화제가 상기 열거된 것 만으로 한정되는 것은 아니고 반응에 영향을 끼치지 않는 범위 내에서 당 업계에 통상적으로 공지된 모든 것이 사용될 수 있다. 또한, 상기 설명한 방법으로 제조된 화학식 1의 화합물은 클로로포름이나 클로로포름/메탄올의 혼합 용매 등의 유기 용매로 추출하고 실리카겔에 의한 흡착크로마토그래피로 정제하면 된다.
- <24> 화학식 1의 화합물의 효능을 확인하기 위한 실험은 다음과 같이 수행되었다. 먼저, 항균 활성 실험은 바실러스 (bacillus) 그리고 대장균에 실시해 보았다. 또한, 아포토시스의 작용이 있는지 알아 보기 위해 면역세포 (HL-60)와 피부암세포 (HacaT)에 대해 세포독성 실험과 DNA 단편화 실험을 해보았다.
- <25> 이러한 실험 결과, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 강한 항균력을 지닌 물질로서 각종 피부 질환에서 수반하는 세균 감염을 효과적으로 막을 수 있고 동반한 염증의 치료에 사용될 수 있다. 또한 화학식 1의 화합물은 면역 세포주에 강한 세포 독

성을 나타내며 아포토시스를 유도하는 생리활성 물질로서 항암제 등 각종 면역 질환의 치료제로서 가능성을 보였다.

<26> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의거하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

<27> 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발

<28> 명의 범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

<29> [실시예 1]

<30> 화학식 1의 N,N-디메틸파이토스핑고신의 제조

<31> 파이토스핑고신 2 g (0.0063 몰)을 메탄올 200 ml에 가하고 40 C 에서 교반하여 녹인다. 0.2 M 보레이트 완충액(pH 9.0)을 메탄올과 동량으로 천천히 가하고 소니케이션으로 분산시킨다. 4 C 아이스 베쓰(ice bath)에서 소듐보로하이드라이드 1 g을 조심해서 가한다. 이 때 끓어 오르는 것을 조심한다. 10분 후 37 % 포름알데히드 수용액을 10 ml씩, 5 분 간격으로 6번씩 가한다. 24 시간 후 같은 방법으로 소듐보로하이드라이드를 한번 더 가한다. 반응은 실온에서 72 시간동안 진행시킨다. 클로로포름을 100 ml를 가하고 증류수로 추출함으로서 반응을 멈춘다. 실리카겔에 의한 흡착크로마토그래피로 정제하여 화학식 1의 화합물을 얻는다. 실리카겔 박층 크로마토그래피 (TLC)로 정제 (클로로포름, 메탄올, 암모니아수 = 80 : 20 : 2, $R_f = 0.6$)하여 백색의 화학식 1의 화합물 1.5 g (수율 68.9 %)을 얻었다. 도 1에서 보는 바와 같이 ^1H NMR로 메틸기가 두 개

도입된 것 (=2.4 ppm, s, 6H)을 확인하였고 도 2에서 보는 바와 같이 MALDI-MASS로 분자량 (계산치 : 346.32, 측정치 : 346.46)을 측정하여 확인하였다.

<32> [실시예 2]

<33> 화학식 1의 N,N-디메틸파이토스핑고신의 항균 활성실험

<34> N,N-디메틸파이토스핑고신의 항균활성을 테스트하기 위하여 그람 양성균인 바실러스 (*Bacillus licheniformis*), 그람 음성균인 대장균 (*E. coli*)를 이용하여 항균 활성을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 이때 사용한 배지는 LB (Bacto peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 10 g/L) 또는 TS (Tryptone 15 g/L, Soytone 5 g/L, Sodium chloride 5 g/L)를 가압 살균하여 이용하였으며 30 ℃또는 37 ℃에서 2-3일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 균수를 측정하여 항균력을 검사하였다. 본 발명에 사용한 N,N-디메틸파이토스핑고신은 에탄올에 녹여 사용하였으며 항균 효과를 파악하기 위해서는 1 ug/ml, 5 ug/ml, 100 ug/ml, 1,000 ug/ml의 농도로 사용하였다. 각각의 미생물을 배양하여 10 배씩 순차적으로 희석하여 각각의 배양 배지에 도말하여 배양한 후 한 평판 배지 당 약 30 ~ 300개의 집락을 형성하는 희석배수를 결정하였다. 각각의 미생물을 배양한 후 상기의 실험에서 결정된 희석배수로 희석하였다. 이때 희석용액으로는 0.85 % NaCl을 사용한다. 상기항의 방법으로 준비한 시료를 시료준비에 사용한 용매에 순차적으로 희석하여 원하는 농도를 만든 후 희석한 시료를 9 ml의 미생물 희석용액에 1 ml 첨가하고 충분히 혼합하였다. 30 ℃또는 37 ℃에서 1시간 방치한 후 (가끔 혼합해줌) 배지에 100 ul씩 도말한 후 각각의 배양조건에서 배양하고 배양이 끝난 후 집락의 수를 측정하였다.

<35> 도 3에서 보는 바와 같이 E. coli와 B. licheniformis에서 모두 그 콜로니의 수가 줄었으며 1 ug/L라는 적은 양으로 콜로니의 양이 40 %까지 줄었음을 알 수 있다.

<36> [실시예 3]

<37> 화학식 1의 N,N-디메틸파이토스핑고신의 세포독성 실험

<38> N-N-디메틸파이토스핑고신의 면역세포주에 대한 항암 효과를 확인하기 위해 아포토시스 (apoptosis)를 검사하였다. 항암제는 그 작용기전과 화학구조에 따라 세포 내 다양한 신호전달경로를 거치게 되지만 결과적으로는 암세포를 분열하기보다는 스스로 괴사하게 하는 아포토시스를 일으킨다. 암세포에 대한 N-N-디메틸파이토스핑고신의 항암 효과를 검사하기 위하여 먼저 세포독성 정도를 측정했으며 그 결과를 토대로 아포토시스를 확인하였다.

<39> 실험에 사용된 면역세포주는 HL-60으로 영구히 분열하는 암세포였으며 세포독성정도는 MTT assay 방법으로 측정하였다. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium)은 배지에 용해 시 노란색을 띠는 염색시약이나 이는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내에 활성을 띠는 dehydrogenase 라는 효소에 의해 보라색 포마잔 (formazan)으로 변색한다. 따라서 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 보라색으로 변색이 줄어들게 되며 그 정도를 흡광도를 통해 측정하게 된다. HL-60 cell을 7×10^4 cell/ml의 수로 96-well plate에 seeding하여 37°C, 5%의 CO₂ 배양기에 24시간동안 배양하였다. 배양 후, N-N-디메틸파이토스핑고신을 serum free RPMI 에 희석하여 6.25 M, 12.5 M, 25 M 그리고 50 M 의 농도로 세포에 처리하여 24 시간동안

배양하였다. 최종 농도가 0.5 mg/ml인 MTT를 각 well에 넣어 3 시간동안 더 배양한 후 피펫으로 염색시약을 용해한 뒤에 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 사용된 물질은 스펡고리피드 유도체의 하나로 이미 면역세포에 세포독성 및 아폽토시스를 유발함이 밝혀진 C2-ceramide를 사용하였다. 그리고 CLA ceramide (Conjugated linoleoyl phytosphingosine)를 또 다른 대조군으로 비교하였다.

<40> 도 4에서 보는 바와 같이 대조군으로 사용된 C2-ceramide 보다 강한 세포 독성 효과를 보였다.

<41> [실시예 4]

<42> 화학식 1의 N,N-디메틸파이토스핑고신의 DNA 단편화 실험

<43> 세포독성을 보인 농도 수준에서 아폽토시스의 대표적인 특징인 DNA 단편화를 검사하였다. 아폽토시스는 세포의 계획된 괴사로 형태학적인 변화뿐만 아니라 크로마틴 (chromatin) 응축, 아폽토틱 바디 (apoptotic body) 형성 등 복잡한 생물학적 특징들이 나타나게 되나 본 실험에서는 그 중에서도 DNA의 단편화를 보았다. HL-60 cell을 1×10^5 cell/10ml 의 수로 seeding하여 37 C, 5 % CO₂의 배양기에 24 시간동안 배양한 후 N,N-디메틸파이토스핑고신과 대조군으로 사용한 물질들을 도 3에서 지시한 농도 하에서 처리하여 24 시간동안 배양하였다. 모든 물질은 에탄

을에 녹였다. 세포를 원심분리를 통해 회수하였으며 lysis buffer (5 mM Tris-HCL (pH7.4), 20 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)를 가하여 세포막을 파쇄하였다. 12,000 rpm으로 10 분 동안 원심분리 한 후, 잘려진 DNA단편들이 용해되어 있는 상층액을 회수하였다. 상층액과 동량의 페놀을 첨가하여 vortexing한 후 12,000 rpm으로 10 분 동안 다시 원심분리를 한 후 상층액을 조심스럽게 회수하였다. Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol (25:24:1) 또는 Chloroform을 통한 DNA 추출법도 위의 페놀방법과 똑같이 이뤄졌다. 여러 용매 처리를 통해 얻어진 상층액에 0.3 M sodium acetate, pH 5.2가 용해된 에탄올을 첨가하여 하루동안 20 C 냉동고에서 침전시켰다. 12,000 rpm으로 10 분 동안 원심분리 한 후, 얻어진 DNA pellet만 남기고 위의 상층액은 따라 버리고 70 % 에탄올을 넣어 씻어주었다. 다시 원심분리 후 상층액은 버리고 남겨진 DNA 절편을 TE Buffer에 녹였다. DNA절편들 외에 존재 가능한 RNA를 제거하기 위해 0.5 mg/ml RNase를 1 l 넣고 37 C에서 30 분 동안 반응시켰다. 1.2% agarose gel 전기영동을 통해 DNA 단편화를 확인하였다.

도 5에서 보는 바와 같이 short-chain ceramide 중 하나인 N-acyl sphingosine (C2-Ceramide)이 25.0 uM 농도에서 DNA의 단편화 현상이 나타난다. N-acyl sphingosine은 아포토시스 유발 물질로서 알려져 있으며 DNA의 단편화 현상은 이러한 효능에 대한 한 예이다. 마찬가지로 N,N-디메틸파이토스핑고신이 같은 농도에서 DNA의 단편화 현상이 일어남을 확인할 수 있었다. 특이한 점은 대조군으로 사용한 C2-Ceramide보다도 더 낮은 농도에서 사다리 모양처럼 명백한 DNA 단편화 현상이 나타났고 그 정도가 더 강하게 나타났다. 세라마이드의 일종인 CLA ceramide는 같은 농도에서 DNA 단편화 현상이 보이지 않았다.

<44> 도5에 나타낸 기호는 다음을 의미한다.

- <45> SM : DNA size marker
- <46> EtOH : ethanol
- <47> 1 : DMPS 12.5 μ M
- <48> 2 : DMPS 25.0 μ M
- <49> 3 : DMPS 50.0 μ M
- <50> 4 : C2 ceramide 25.0 μ M
- <51> 5 : C2 ceramide 50.0 μ M
- <52> 6 : CLA ceramide 25.0 μ M
- <53> 7 : CLA ceramide 50.0 μ M

【발명의 효과】

- <54> 본 발명에 의한 화합물 및 그를 포함하는 조성물을 이용하면, 항균, 항염 및 항암 등에 효과가 기대되고 또한 대량 생산으로 활용도가 높은 효과가 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

파이토스핑고신의 아민기에 알킬기가 결합된 것을 특징으로 하는 화합물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 알킬기는 메틸, 에틸을 포함하여 짧은 체인인 것을 특징으로 하는 화합물.

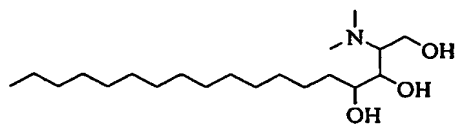
【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 알킬기는 한 개 또는 두 개인 것을 특징으로 하는 화합물.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 1의 N,N-디메틸파이토스핑고신 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물.

[화학식 1]

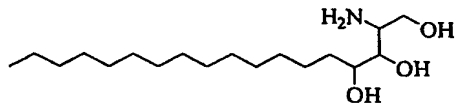


【청구항 5】

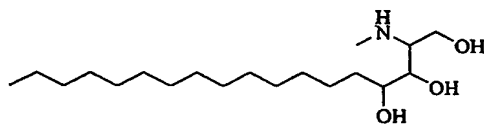
제4항에 따른 화학식 1의 N,N-디메틸파이토스핑고신 화합물의 제조방법으로서,

하기 화학식 2의 파이토스핑고신을 용매 중에서 환원제의 존재 하에 포름알데히드와 반응시켜 하기 화학식 3을 중간물질로 하여 제조하는 것을 특징으로 하는 방법.

[화학식 2]



[화학식 3]



【청구항 6】

제4항에 따른 N,N-디메틸파이토스핑고신 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물.

【청구항 7】

제4항에 따른 N,N-디메틸파이토스핑고신 화합물을 유효성분으로 포함하는 항염용 조성물.

【청구항 8】

제4항에 따른 N,N-디메틸파이토스핑고신 화합물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물.

【청구항 9】

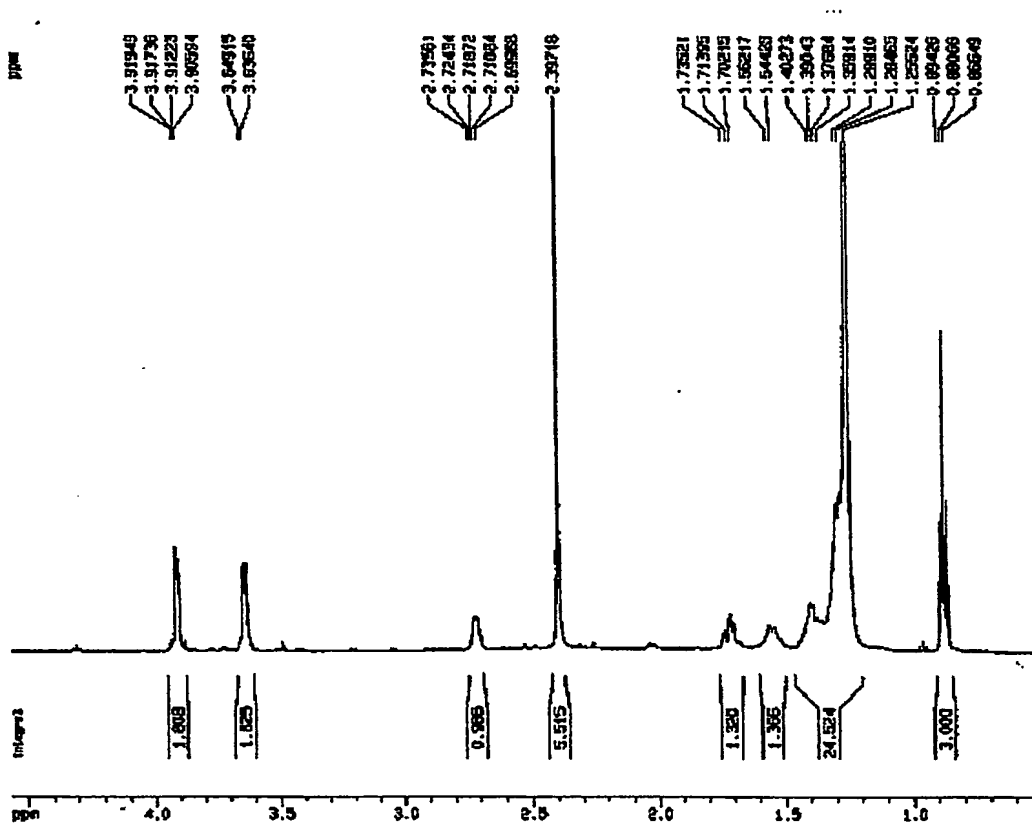
제4항에 따른 N,N-디메틸파이토스핑고신 화합물을 유효성분으로 포함하여 세포살상을 통해 항암효과를 나타내는 세포살상제 조성물.

【청구항 10】

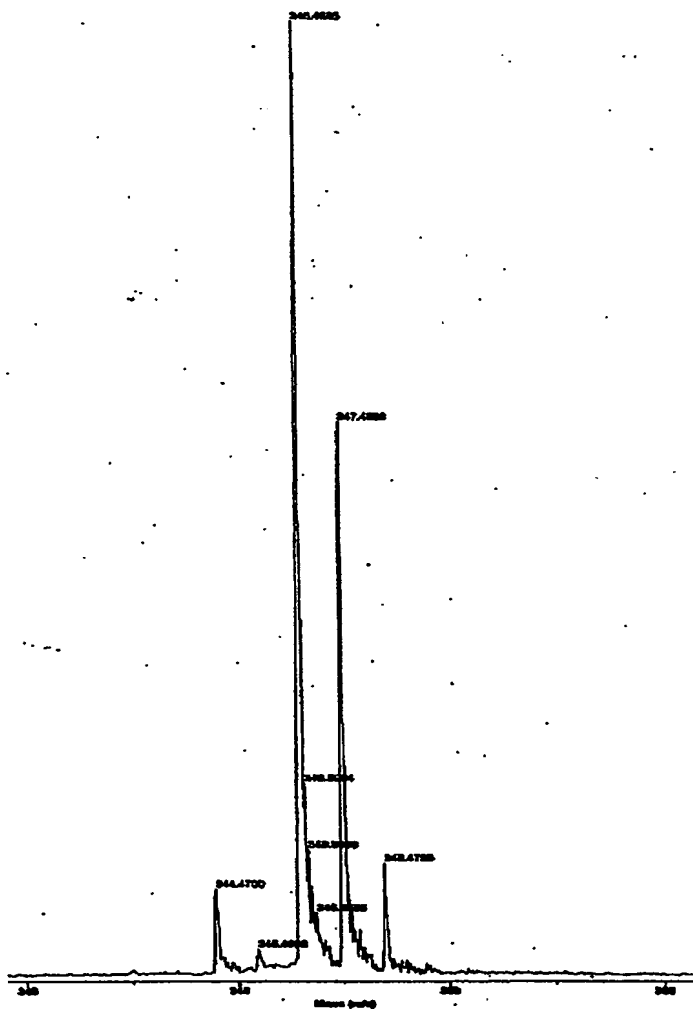
제9항에 있어서, 상기 세포살상제는 단위 체중 당 0.5 내지 2.5mg/kg의 양으로 투여되는 것을 특징으로 하는 세포살상제 조성물.

【도면】

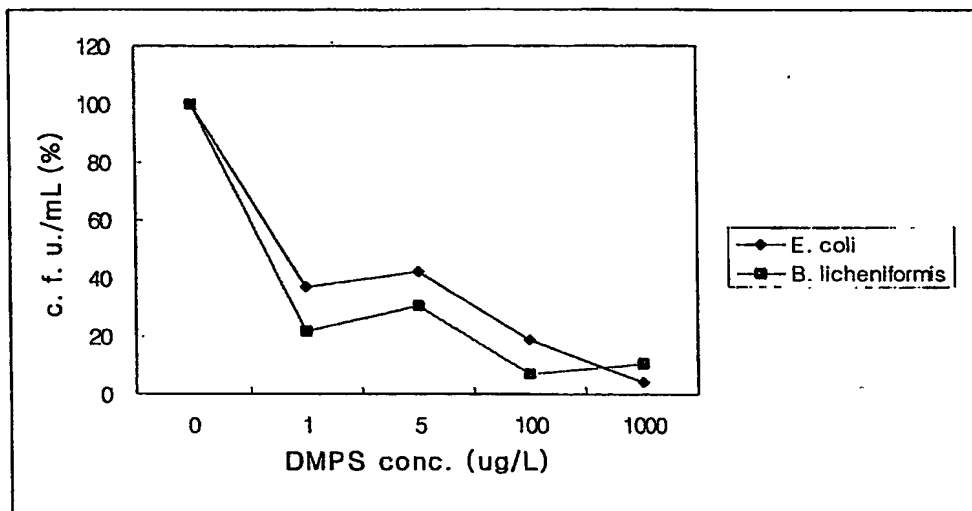
【도 1】



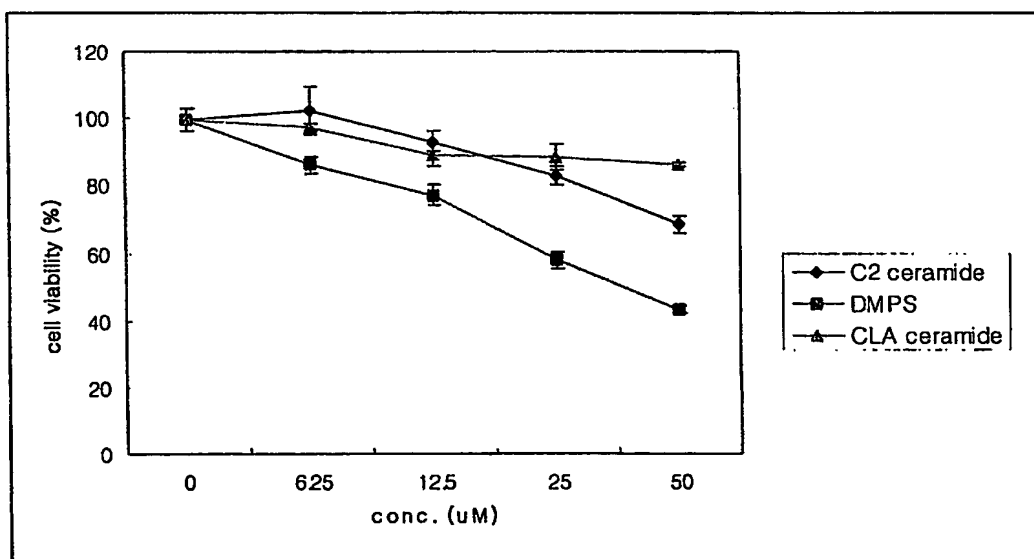
【도 2】



【도 3】



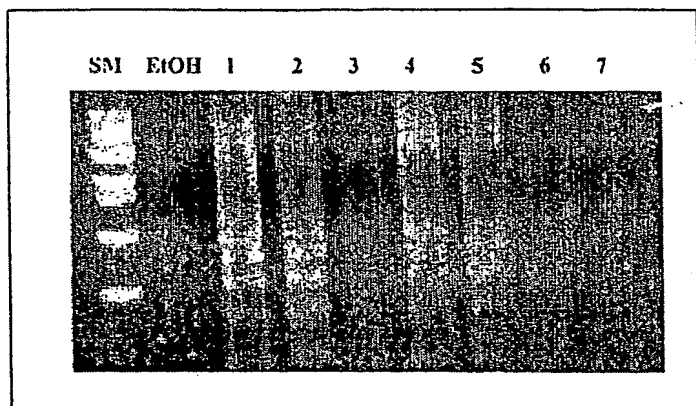
【도 4】



020024245

출력 일자: 2003/5/12

【도 5】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.